

Gaschromatographische Untersuchungen über das Aroma von Rohwurst*

Von

HANS ESER und F. P. NIINIVAARA

Mitteilung aus dem Institut für Fleischtechnologie der Universität Helsinki

Mit 3 Textabbildungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen umfangreicher Untersuchungen an einer finnischen Rohwurst durchgeführt (1, 2, 3), wobei der gaschromatographische Teil zum Ziel hatte, die organoleptisch festgestellten Unterschiede zwischen verschiedenen Würsten durch Analysenergebnisse zu belegen. Dies ist im Hinblick auf die Entwicklung von Starterkulturen, die sich positiv auf Aroma, Geschmack und die Reifungszeit der Rohwurst auswirken, von großer Bedeutung. Gleichzeitig hoffen wir einen Beitrag zu leisten zur Erforschung des Rohwurstaromas, über das bis heute noch sehr wenig bekannt ist. Das Ziel ist, eine Beziehung zu erhalten einerseits zwischen isolierten Verbindungen und organoleptischer Beurteilung, andererseits zwischen isolierten Verbindungen und zugesetzten Bakterien. Aus diesen Beziehungen wäre es möglich, Bakterien auf einfache Art zu testen, ob sie die Fähigkeit besitzen, positiv zum Aroma der Rohwurst beizutragen. Die Identifizierung der einzelnen isolierten Verbindungen trat für uns also vorerst bewußt in den Hintergrund.

I. Methode

Prinzipiell kam für uns nur eine Methode in Frage, die sich für Reihenanalysen eignet. Der Arbeitsaufwand durfte nicht allzu groß sein und die zur Untersuchung benötigte Menge Wurst sollte in einem vernünftigen Rahmen bleiben.

Die Methode zur Isolierung und Analyse von Carbonylen unter Verwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Derivaten ist weit verbreitet und auf die verschiedensten Arten angewendet worden. Im Speziellen folgten wir bei der Isolierung der Carbonyle einer von E. HONKANEN und P. KARVONEN (4) für die Untersuchung von Milch-Carbonylen entwickelten Methode, die wir für unsere Zwecke etwas modifiziert haben.

Arbeitsvorschrift

1. Carbonylfreie Lösungsmittel

Methanol, Benzol, Äther: Die handelsüblichen Lösungsmittel (Fa. E. Merck, Darmstadt); pro analysi werden 2 Tage lang (Methanol 4 Tage) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2 g/l) und einigen Tropfen konz. Phosphorsäure am Rückfluß gekocht. Anschließend werden die Lösungsmittel zweimal destilliert, wobei je ein angemessener Vorlauf und Rückstand entfernt wird (5). Wasser: Dest. Wasser wird während einer Stunde in einem offenen Gefäß gekocht.

* Diese Arbeit ist mit einem Stipendium von dem Landwirtschaftsministerium der USA (USDA, Agricultural Research Service) finanziert worden.

2. Isolierung der Carbonyle

100 g Wurst werden mit 300 g carbonylfreiem Wasser homogenisiert und während genau zwei Stunden im Vakuum (16–17 mm Hg) auf einem thermostatisierten Wasserbad bei 37° C destilliert. Gleichzeitig wird mittels einer Capillare ein schwacher Stickstoffstrom durchgeleitet. Das Destillat wird in zwei aufeinanderfolgenden in Eiswasser gekühlten Vorlagen aufgefangen, die zusammen 75 ml einer Lösung von 4 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 1000 ml 2 n-carbonylfreier Salzsäure enthalten. Bei diesem Vorgang werden die Carbonyle in ihre Hydrazonderivate übergeführt. Nach Beendigung der Destillation werden die beiden Vorlagen vereinigt und mit carbonylfreiem Wasser auf 400 ml aufgefüllt (davon werden 10 ml zur Bestimmung des Carbonylindex verwendet). Die Lösung wird 5mal mit je 25 ml carbonylfreiem Benzol geschüttelt. Die vereinigten Benzolphasen werden durch zweimaliges Schütteln mit Natriumhydrogencarbonat von etwa anwesenden Säuren befreit. Nun wird die Benzollösung mit 125 ml carbonylfreiem Methanol versetzt. Das überschüssige 2,4-Dinitrophenylhydrazin wird durch Behandlung mit Dowex 50 Ionentauscher (Cl⁻-Form; Säulenverfahren) entfernt (6). Durch Halbieren der Benzol-Methanol-Lösung werden nun zwei parallele Proben erhalten. Im Vakuumrotationsverdampfer wird das Lösungsmittel (Benzol und Methanol) verdampft wobei die Hydrazone zurückbleiben. Diese werden in wenig Äther gelöst und in ein kleines U-Rohr pipettiert. Der Äther wird fortwährend ausgeblasen.

3. Trennung der Carbonyle

Unmittelbar vor der Analyse fügt man in das U-Rohr 0,25 ml einer ätherischen Lösung von α -Ketoglutar säure (20 mg/ml) und verdampft den Äther. Durch kurzes Erhitzen (ca. 30 sec)

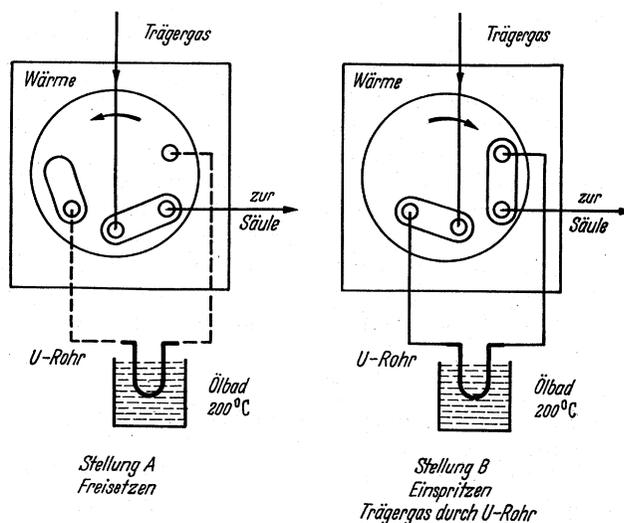


Abb. 1. Schema für das Freisetzen und Einspritzen der Carbonyle

auf 200° C können die Carbonyle wieder freigesetzt werden (7). Sofort leitet man 15 sec lang den Trägergasstrom durch das U-Rohr, wodurch die Carbonyle in die Trennsäule gespült werden (vgl. Abb. 1).

Chromatographische Bedingungen: Perkin-Elmer Fraktometer 116 E mit Flammenionisationsdetektor,

Schreiber: Siemens-Kleinkompensograph.

Säule: Polyäthylenglykol 1500, 2 m (Fabrikbezeichnung K).

Trägergas: Stickstoff 75 ml/min p: 1,25 kg/cm².

Temperatur: 155° C.

4. Bestimmung des Carbonylindex (8, 9)

Um den Carbonylindex zu bestimmen, werden die vereinigten Destillate mit carbonylfreiem Wasser auf 400 ml aufgefüllt; 10 ml davon werden in einen 25 ml Meßkolben gegeben, mit

Wasser verdünnt und mit 5 ml frisch zubereitetem KOH-Reagens versetzt (KOH-Reagens: 5 g KOH werden in 10 ml carbonylfreiem Wasser gelöst und mit carbonylfreiem Methanol auf 50 ml ergänzt). Nach Auffüllen zur Marke mit carbonylfreiem Wasser schüttelt man einige Male gut durch. Die Absorption wird nach genau 10 min bei 480 $m\mu$ gegen eine aus 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens hergestellte Blindprobe gemessen.

II. Durchgeführte Versuche

1. Der verwendete Rohwursttyp

Zur Untersuchung verwendeten wir eine nach folgendem Rezept hergestellte finnische Rohwurst: 35 % Schweinefleisch, 35 % Rindfleisch, 30 % Schweinefett, pro kg 33 g Salz und 5 g Gewürze; als Mikrokokken-Starterkultur wurde das Präparat „Baktoferment“ (Hersteller: Rud. Müller, Hamburg) verwendet. Die Würste wurden in einer vollautomatischen Klimarauchanlage (Hersteller: Autotherm, Waxweiler, Harz) während 8 Tagen getrocknet (relative Luftfeuchtigkeit am Anfang 95%, später 85%, Temp. 18° C) und darauf in Kühlräumen gelagert. Die untersuchten Würste entstammen je einer Partie von 400 kg, die routinemäßig in einer finnischen Fleischwarenfabrik (Fa. Liha-kunta, Kuopio) hergestellt wurden.

2. Die Versuchsserien

Von den Würsten wurden während der ersten Tage täglich, später in größeren Abständen, eine gaschromatographische Untersuchung (inclusive Bestimmung des Carbonylindex) durchgeführt. Wir versuchten auf diese Weise einen Einblick zu bekommen, wie sich die verschiedenen durch unsere Methode erfaßten Verbindungen im Laufe der Reifung und Lagerung verhalten, wann sie entstehen, und ob sie wieder verschwinden. Wir führten eine zweite Serie (IV-A-G₂) unter möglichst gleichen Bedingungen durch, um ein besseres Bild für die Beurteilung der Chromatogramme zu erhalten.

III. Versuchsergebnisse

1. Die Chromatogramme

Abb. 2 zeigt drei Chromatogramme der Serie IV-A-G₁, die 1, 10 und 133 Tage nach der Herstellung der Rohwurst erhalten wurden. Die Peaks (Nr. 2, 5, 8, 11, 23,

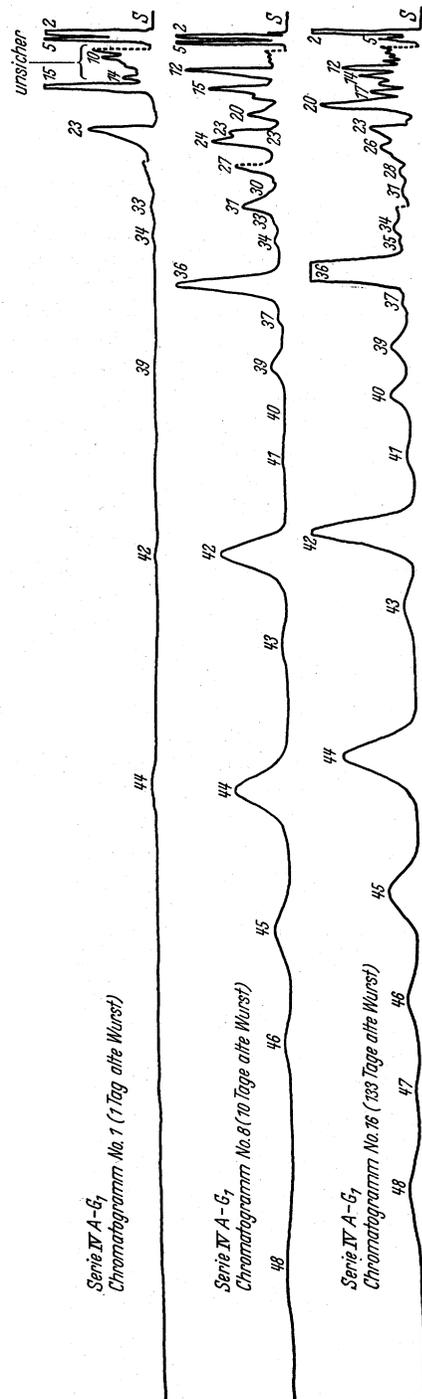


Abb. 2. Drei der 16 in der Reihe IV-A-G₁ erhaltenen Chromatogramme, 1, 10 bzw. 133 Tage nach Bereitung der Wurstmasse aufgenommen

24, 36), die wir auch in Blindproben erhalten haben, sind punktiert gezeichnet. Die Peaks Nr. 24 und 36 treten in den Chromatogrammen der Wurst jedoch teilweise um ein Mehrfaches stärker auf.

Ein erster Vergleich zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen dem Chromatogramm der ganz jungen Wurst und demjenigen nach dem Reifungsprozeß. Viel geringer sind die Unterschiede zwischen dem 10. und dem 133. Tag nach der Herstellung. Das Gesamtbild verändert sich nach dem 3. bis 5. Tag nur noch unwesentlich.

Diese Feststellungen gelten für beide Wurstversuche G_1 und G_2 mit dem Unterschied, daß das erste Chromatogramm der Serie G_2 eine „weiter entwickelte“ Wurst zeigte, das heißt das erste Chromatogramm der Serie G_2 ist im Charakter mehr mit dem zweiten oder dritten Chromatogramm der Serie G_1 zu vergleichen als mit dem ersten.

Eine detaillierte Auswertung der Chromatogramme bereitet einige Mühe, denn sie sind zu komplex und zu unklar. Viele „Peaks“ sind nur ungenügend getrennt und in der Anfangsphase wird die Nulllinie überhaupt nicht wieder erreicht. Es muß fast als sicher angenommen werden, daß im Bereich der ersten 30 sichtbaren Maxima eine weit größere Anzahl Verbindungen vorhanden ist, die aber infolge von Überlagerungen nur teilweise oder überhaupt nicht sichtbar sind. Ferner ist zu beachten, daß die Isolierungsmethode für flüchtige Carbonyle entwickelt wurde, daß aber ein großer Teil anderer neutraler Verbindungen im Aufarbeitungsprozeß nur ungenügend oder überhaupt nicht abgetrennt wird.

Aus den angeführten Gründen hat es wenig Sinn, die einzelnen Peaks nach einer der gebräuchlichen Methoden auszumessen. Es ist jedoch gut möglich bei gemeinsamer Betrachtung aller Chromatogramme für einzelne Peaks die Veränderungen im Laufe der Reifung und Lagerung zu verfolgen. Es wurde gefunden, daß nach dem 4. Tage nur noch wenig und nach dem 10. Tage nur noch 2 neue Peaks entstehen. (Wir wollen immer von „Peaks“ sprechen und nicht von Verbindungen, da in unseren Kurven wie erwähnt die Zahl der Peaks kaum mit der Zahl der Verbindungen übereinstimmen dürfte.) Im weiteren ist deutlich, daß unter den Peaks mit kleinerer Retentionszeit, also in dem Bereich, in dem sich vor allem flüchtige Carbonyle befinden, nach etwa 3 Wochen kaum noch Veränderungen stattfinden, während die Peaks im Bereich der höheren Retentionszeit (ab Peak Nr. 34) im Zeitraum von 3–4 Wochen nach der Herstellung der Rohwurst eine deutliche quantitative Zunahme erfahren, wobei auch noch neu die Peaks Nr. 11 a, 47 und 48 auftreten. (Die quantitative Beurteilung von Peaks, die nicht durch Carbonyle gebildet werden, muß allerdings mit Vorsicht erfolgen.)

Zusammenfassend kann man aus diesen ersten Versuchen folgendes festhalten:

Die erfaßten Veränderungen erfolgten in den ersten 3–4 Tagen nach Herstellung der Rohwurst.

Das Gesamtbild der Chromatogramme blieb später über die ganze Versuchsdauer konstant.

Die Peaks mit hoher Retentionszeit (ab Peak Nr. 34) erfuhren 3–4 Wochen nach Herstellung der Rohwurst eine quantitative Zunahme und behielten ihre Größe während der ganzen Versuchsdauer bei.

Die Mehrzahl der Peaks zeigt im Laufe der Reifung und Lagerung quantitativ eine deutliche Zunahme. Nur wenige Peaks (z. B. Nr. 12, 28, 31) nehmen nach anfänglicher Zunahme wieder ab.

Ein völliges Verschwinden von einmal aufgetretenen Peaks konnte nicht festgestellt werden.

Spätere Erkenntnisse können möglicherweise neue Interpretationen der Kurven erlauben.

2. Der Carbonylindex

Die Methode, nach der wir den Carbonylindex bestimmten, kann nur ein orientierendes Bild geben, da bei der Destillation in den Vorlagen immer ein unkontrollierter Teil des 2,4-Dinitrophenylhydrazins ausfällt. Darauf sind auch die negativen Werte im Anfang zurückzuführen. Trotzdem ergaben die Kurven (Abb. 3) ein deutliches Bild, das im Kurvenverlauf für beide Serien übereinstimmt:

Starkes Ansteigen des Carbonylgehaltes am Anfang,

ein Maximum zwischen dem 9. und 11. Tag nach dem Beginn der Herstellung der Rohwurst und

ein Abfallen zu einem eher tiefen Wert, der dann während der ganzen Versuchsdauer ungefähr konstant blieb.

Die Indexzahlen entsprechen den abgelesenen Absorptionwerten und wurden nicht auf eine Eichkurve bezogen, denn die erhaltenen Werte sollten den Charakter einer orientierenden Angabe beibehalten.

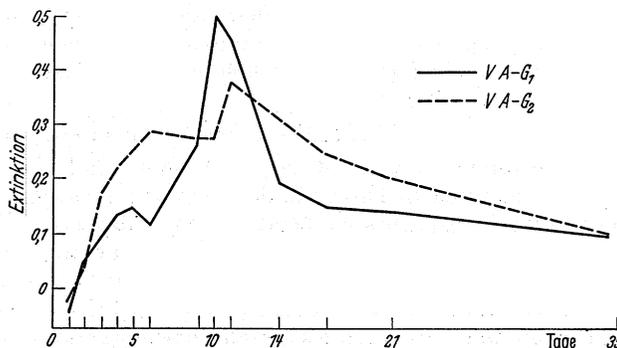


Abb. 3. Der Carbonylindex der Rohwurst im Verlauf der Reifung und der Lagerung in den Serien VA-G₁ und VA-G₂.

IV. Diskussion

1. Diskussion der Methode

Nach den ersten systematischen Versuchsserien ist es wichtig, sich über die Tauglichkeit der Methode Rechenschaft zu geben und etwaige Verbesserungen ins Auge zu fassen.

Die Vorteile der Methode sind ihre Einfachheit und der relativ geringe Aufwand an Zeit und Material, was für Reihenanalysen unerlässlich ist. In ihren Grundzügen betrachten wir die Methode als taugliches Mittel.

Der Hauptnachteil der Methode ist die für manche Zwecke ungenügende Trennung der Verbindungen sowie die Tatsache, daß nicht alle erfaßten Verbindungen quantitativ beurteilt werden können. Wir haben die folgenden Versuche unternommen, die Hydrazone vor dem Einspritzen von den anderen neutralen Begleitstoffen zu trennen:

Kurzes Erhitzen auf 200° C.

Längeres Erhitzen auf 80–150° C im Vakuum.

Keine dieser Methoden konnte befriedigen. Auf diese Weise gelang es jedoch, durch Analyse der behandelten U-Röhrchen Hinweise zu erhalten, welche Peaks möglicherweise durch Carbonyle gebildet werden und welche nicht.

Eine wirksamere Vortrennung kann durch säulenchromatographische Methoden erreicht werden, was jedoch den zeitlichen Aufwand erheblich steigert (z. B. D. P. SCHWARTZ u. Mitarb., 1961 (10); D. P. SCHWARTZ u. Mitarb., 1962 (11); D. P. SCHWARTZ, 1962 (12); J. SCHORMÜLLER und W. GROSCH, 1962 (13)).

Ein weiterer und für die Dauer wirksamerer Weg wäre der Ausbau der gaschromatographischen Methode, d. h. die gleichzeitige Analyse mit einer gepackten und einer Capillarkolonne.

Entscheidend bleibt aber, daß man durch die Beschäftigung mit Carbonylen nicht das Gesamtproblem aus den Augen verliert. Die Frage ist offen, ob es zur Erreichung unseres Zieles nicht sinnvoller ist, auch andere flüchtige Verbindungen wie Amine, Ester, Lactone, Alkohole usw. zu erfassen, bevor man sich einseitig auf Carbonyle spezialisiert.

2. Diskussion der Versuchsergebnisse

Die gefundenen Resultate stellen die ersten Erfahrungen dar, die wir in der relativ kurzen Zeit gemacht haben, in der wir uns mit der gaschromatographischen Untersuchung von Rohwürsten befaßten. Sie dürfen im einzelnen nicht überbewertet werden, da sie nicht frei von Fehlern sind, die auf Anfangsschwierigkeiten zurückzuführen sind. Sie weisen jedoch einen Weg, den zu verfolgen sich lohnen wird.

Nach den bisherigen Versuchen ist es noch nicht möglich, Beziehungen zwischen Bakterien und Gaschromatogramm bzw. organoleptischer Beurteilung und Gaschromatogramm aufzustellen. Dieses Ziel kann jedoch nach unserer Ansicht auf diesem Weg erreicht werden.

Das bis jetzt vorliegende Materiel erlaubt nicht, eine gültige Aussage über die Bedeutung der Carbonyle für das Rohwurstaroma zu machen. Ein überraschendes Ergebnis war jedoch ihr starkes Zurückgehen nach etwa 10 Tagen (gleichzeitig werden auch einige Peaks, z. B. Nr. 31, später auch Nr. 12, deutlich kleiner). Hier möchten wir auch noch speziell darauf hinweisen, daß wir für die Destillation 100 g Wurst, nicht Trockensubstanz, verwendeten, also die fortschreitende Austrocknung vernachlässigten. Dieser Vorgang läuft aber dem Absinken des Carbonylindex entgegen.

Es mag als Mangel empfunden werden, daß für keinen dieser Peaks eine Identifikation versucht worden ist. Dafür gibt es vor allem zwei Gründe: Einerseits sind die Peaks bis zu einer Retentionszeit von etwa 10 min (Peak Nr. 31) so schlecht getrennt, daß die Identifizierung unter den angewendeten Versuchsbedingungen nicht möglich war. Andererseits ist für unsere Problemstellung die Identifizierung der Peaks erst von sekundärer Bedeutung, so interessant sie auch von manchem Standpunkt aus gesehen sein mag. Um die Bedeutung einer Verbindung oder einer Gruppe von Verbindungen für das Aroma ermessen zu können, ist es nicht notwendig, sie identifiziert zu haben. In erster Linie wollen wir wissen, welche "Peaks" in einer Rohwurst wünschenswert sind und welche nicht; und es wird uns möglich sein, einen Bakterienstamm auf seine Fähigkeit zu testen, diese "Peaks" hervorzubringen, ohne daß wir über die Identität derselben Klarheit haben. Andererseits würde es auch nicht genügen, die Verbindungen zu identifizieren, da dies noch nicht über ihre Wirkung auf das Aroma aussagt. Diese Beziehung muß vorerst noch für jede isolierte Substanz, ob identifiziert oder nicht, bestimmt werden. Um dieses Ziel zu verfolgen, wird es vorerst wünschenswert sein, einzelne Verbindungen oder Verbindungsgruppen nach der Analyse aufzufangen (sie stellen ja ein Konzentrat aus 50–100 g Wurst dar) und sie organoleptisch zu beurteilen. Die nur zur Diskussion stehenden Resultate bilden einen ermutigenden Schritt für weitere Forschung in dieser Richtung.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur Isolierung und gaschromatographischen Analyse von flüchtigen Carbonylen aus Rohwurst und anderen Fleischprodukten beschrieben.

Die Methode ist in bezug auf Material und Zeitaufwand speziell für Reihenanalysen geeignet. Da die Zahl der Verbindungen sehr hoch ist, kann die in dieser Arbeit durchgeführte Trennung der Komponenten noch nicht in allen Beziehungen befriedigen. Die Resultate der ersten zwei hier mitgeteilten Versuchsserien ergaben jedoch bereits einen gewissen Einblick in die Entwicklung des Aromas bei der Reifung und Lagerung einer finnischen Rohwurst. Der Total-Carbonylgehalt (angegeben durch einen Carbonylindex) stieg am Anfang der Reifung stark an, erreichte zwischen dem 9. und 11. Tag nach der Herstellung des Wurstbrätes ein Maximum und fiel darauf auf einen eher tiefen Wert, der bis zum Ende der Versuchsdauer von 133 Tagen ungefähr konstant blieb. Teilweise durchliefen die Konzentrationen der einzelnen Komponenten deutliche Kurven, die in den beiden Parallelserien weitgehend übereinstimmten. Die erfaßten Veränderungen erfolgten im wesentlichen in den ersten 3-4 Tagen der Reifung. Die später erhaltenen Chromatogramme waren einander weitgehend ähnlich. Die Komponenten mit hoher Retentionszeit erfuhren 3-4 Wochen nach der Herstellung der Rohwurst eine quantitative Zunahme, wobei gleichzeitig noch zwei neue Komponenten auftraten. Nur wenige Komponenten nehmen nach anfänglicher Zunahme wieder ab, ohne daß ein endgültiges Verschwinden von einmal aufgetretenen Komponenten festgestellt werden konnte. Eine Identifizierung der einzelnen Peaks erfolgte bisher noch nicht.

Literatur

1. NIINIVAARA, F. P., u. M. S. POHJA: Diese Z. **104**, 413 (1956).
2. NIINIVAARA, F. P., u. M. S. POHJA: Diese Z. **106**, 187 (1957).
3. NIINIVAARA, F. P., u. M. S. POHJA: Diese Z. **106**, 298 (1957).
4. HONKANEN, E., u. P. KARVONEN: Acta Chem. Scand. **17**, 1357 (1963).
5. CHANG, S. S., u. F. A. KUMMEROW: J. Amer. Oil Chem. Soc. **32**, 341 (1955).
6. SCHWARTZ, P. P., A. R. JOHNSON u. O. W. PARKS: Use of ion exchange resins in the micro-analysis of 2,4-DNPH. Dairy Products Laboratory USDA, Washington 25, D. C. Persönliche Mitteilung.
7. KEENEY, M.: Analytic. Chem. **29**, 1489 (1957).
8. LAPPIN, G. R., u. L. C. CLARK: Analytic. Chem. **23**, 541 (1951).
9. CHANG, S. S., u. F. A. KUMMEROW: J. Amer. Oil Chem. Soc. **32**, 341 (1955).
10. SCHWARTZ, D. P., O. W. PARKS u. M. KEENEY: Separation of 2,4-DNPH-derivates of aliphatic monocarbonyls. Dairy Products Laboratory USDA, Washington 25, DC (Nov. 1961) (Sonderdruck).
11. SCHWARTZ, D. P., A. R. JOHNSON u. O. W. PARKS: Microchem. J. **6**, 37 (1962).
12. SCHWARTZ, D. P.: Separation of homologous series of 2,4-dinitrophenylhydrazones by column chromatography. Dairy Products Laboratory USDA, Washington 25, DC (Aug. 1962) (Sonderdruck).
13. SCHORMÜLLER, J., u. W. GROSCH.: Diese Z. **118**, 385 (1962).